

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМЕНІ ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

ЄЛЬЧІЩЕВА ЮЛІЯ ВОЛОДИМИРІВНА



УДК 602.3:582.284]:604.4

**РОЗРОБКА СПОСОБІВ КУЛЬТИВУВАННЯ КАРОТИНОНОСНИХ
ДРІЖДЖІВ *RHODOSPORIDIUM DIOBOVATUM* IMB Y-5023**

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Науково-дослідному інституті біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Божков Анатолій Іванович – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна МОН України, директор науково-дослідного інституту біології, завідувач кафедри молекулярної біології та біотехнології.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник **Посєдинок Наталія Леонідівна** – ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», старший науковий співробітник відділу клітинної біології і біотехнології;

доктор біологічних наук, професор
Кричківська Лідія Василівна – Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут» МОН України, завідувач кафедри органічного синтезу і нанотехнологій.

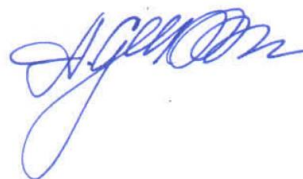
Захист відбудеться 19 жовтня 2018 р. об 11⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.002.28 при Національному технічному університеті України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» за адресою: 03056, м. Київ, пр. Перемоги, 37, корп. 4, ауд. 258.

З дисертацією можна ознайомитись у Науково-технічній бібліотеці ім. Г.І. Денисенка Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» за адресою: 03056, м. Київ, пр. Перемоги, 37.

Відгуки на автореферат просимо надсилати за адресою: 03056, Україна, м. Київ, пр. Перемоги, 37, корп. 1, кімната 158, відділ вченого секретаря КПП ім. Ігоря Сікорського.

Автореферат розіслано “____” вересня 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
Д 26.002.28, д.б.н., доц.



О.Ю. Галкін

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Отримання кормового і харчового білку, повноцінного за амінокислотним складом, являється одним із завдань сучасної біотехнології. Дефіцит повноцінного білку в раціоні людей і тварин призводить до серйозних наслідків: порушення росту і розвитку (Desai et al., 1996), втрати маси і пригнічення активності ферментативних систем, що викликає виникнення цілого ряду різних патологій (Huang et al., 1993; Smil, 2002).

Разом з цим, найважливішими компонентами харчування для нормального функціонування організму є вітаміни та інші біологічно активні речовини, у тому числі каротиноїди. Як відомо, нестача вітамінів також призводить до порушення багатьох процесів в організмі, зокрема, зміни активності ферментів, виникнення багатьох захворювань, зменшення тривалості життя (Fletcher et al., 2002; Galan et al., 2005).

Особливу роль у метаболізмі відіграють каротиноїдні пігменти, які не синтезуються в організмі людини й тварин, тому вони повинні надходити з їжею в необхідній кількості. Каротиноїди мають антиоксидантні, протипухлинні, радіопротекторні, антисклеротичні, протизапальні та імуномодулюючі властивості, деякі з них є попередниками вітамінів, зокрема, β -каротин є попередником вітаміну А (Stahl et al., 2005; Walter et al., 2011). Вони підвищують резистентність організму до мутагенних та канцерогенних факторів (Сімонова, 2010).

Щорічно на рак захворює 10 мільйонів людей, вмирає 6,2 мільйона людей, при цьому 80 % онкологічних захворювань залежить від способу життя. 30-50 % пухлин виникає через незбалансоване харчування, зокрема з низьким вмістом каротиноїдів (Blumberg, 1994; Krinsky et al., 2005; Voutilainen et al., 2006).

Збагачення раціону харчування каротиноидами (β -каротином - 6-8 мг щодня) дозволяє знизити ризик раку легенів у 2-3 рази, раку стравоходу в 3-5 разів, шийки матки в 3-5 разів (Ziegler et al., 1989; Palozza, 2011).

Згідно з останніми дослідженнями BBC (Report Code: FOD025E), світовий ринок каротиноїдів становив \$ 1,5 млрд у 2014 році, очікується, що цей ринок досягне майже \$ 1,8 млрд у 2019 році, із середнім темпом річного приросту (CAGR) 3,9 % (März, 2015).

В наш час мікробіологічний синтез каротиноїдів є однією з галузей біотехнології, що найбільш інтенсивно розвивається. Його перевага полягає в тому, що він може бути здійснений у контрольованих умовах, на відміну від рослин. Мікроорганізми легко культивуються і швидко розмножуються, часто на дешевих живильних середовищах, а вміст пігментів відносно сталий і не залежить від географічного положення та кліматичних умов (Marova et al., 2011). Здатність синтезувати каротиноїди виявлена в обмеженій кількості мікроорганізмів, серед яких найбільш відомими бактерії *Flavobacterium* (Masetto et al., 2001) і *Micrococcus* (Netzer et al., 2010), міководорості *Dunaliella* (Ye et al., 2008) і *Haematococcus pluvialis* (Lorenz et al., 2000; Guerin et al., 2003; Pérez-López et al., 2014), пліснява *Blakeslea trispora* (Schmidt et al., 2005) та

базидіальні дріжджі *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Stachowiak, 2013), *Sporobolomyces* і *Rhodotorula* (Davoli et al., 2004).

Разом з цим об'єктом для отримання каротиноїдних пігментів можуть бути й дріжджі *Rhodospiridium diobovatum* ІМВ Y-5023, дослідженню яких, на жаль, біотехнологи не приділяли належної уваги. Ці дріжджі становлять великий інтерес для біотехнології не тільки завдяки своїй здатності синтезувати каротиноїдні пігменти (Buzzini et al., 2007), а й накопичувати досить велику кількість ліпідів у своїй біомасі (Munch et al., 2015), а також тим, що вони мають антибіотичну дію по відношенню до деяких збудників хвороб рослин (Utkhede et al., 2004).

Однак, можливість отримання біомаси та каротиноїдів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 вивчена недостатньо, але є актуальною для сучасної біотехнології.

Відомо, що швидкість накопичення каротиноїдів у клітинах мікроорганізмів залежить не тільки від генотипу, але й від умов культивування (Божков и др., 2003). Проте, вплив умов культивування на ріст дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 і на їх каротиногенез залишається малодослідженим. Разом з цим, ці знання необхідні як для їх практичного застосування в біотехнології, так і для розуміння механізмів регуляції каротиногенезу *R. diobovatum* ІМВ Y-5023.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у відділі клітинної біології та біотехнології НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна відповідно до НДР №ДР 0112U000099 «Дослідження епігенетичних механізмів індукованої резистентності до токсичної дії важких металів на різних етапах онтогенезу», №0115U000485 «Розробка концепції «динамічних функціональних мереж» на рослинних і тваринних моделях».

Мета та задачі досліджень. Метою роботи була розробка таких способів культивування дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023, що дозволять отримати високий вихід біомаси та каротиноїдів даного продуценту.

Для досягнення поставленої мети були визначені наступні **задачі**:

1. Визначити динаміку росту і вихід біомаси дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на різних живильних середовищах.
2. Розробити способи оптимізації природних нестандартних живильних середовищ для культивування дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023.
3. Вивчити пігментний склад біомаси дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 за культивування на різних живильних середовищах.
4. Визначити вплив освітленості різної інтенсивності на ріст і синтез каротиноїдів дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 за культивування на різних живильних середовищах.
5. Визначити вплив складу живильних середовищ на вихід біомаси і каротиногенез дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023.

Об'єкт досліджень: біотехнологічні процеси отримання каротинвмісної біомаси на основі дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023.

Предмет досліджень: закономірності накопичення біомаси, біосинтезу каротиноїдів штамом дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023.

Методи досліджень. У роботі використані мікробіологічні методи (культивування базидіоміцетів), метод високоефективної рідинної хроматографії суміщеної з мас-спектрометрією (вміст загальних каротиноїдів, якісний склад каротиноїдів, вміст моно- і олігосахаридів у середовищах культивування), метод зважування (біомаса дріжджів), мікроскопічні методи (кількість клітин дріжджів), спектрофотометричні методи (вміст загальних каротиноїдів у біомасі: вміст загальних ліпідів, загального вуглецю і загального азоту в середовищі культивування), статистичні методи обробки даних (програмний пакет Statistica version 10 (StatSoft Inc., OK, US)).

Наукова новизна одержаних результатів. Наукова новизна результатів досліджень, отриманих особисто здобувачем, полягає у наступному:

У роботі вперше:

- Показано, що екстракти пшеничних висівок можуть бути використані як субстрат для культивування каротиноносних дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023. Послідовне культивування на екстракті пшеничних висівок *Pleurotus ostreatus* → *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 забезпечувало збільшення виходу біомаси цих дріжджів на 40 % порівняно з екстрактом висівок без попереднього культивування *P. ostreatus*. Розроблено схему послідовного культивування *P. ostreatus* → *R. diobovatum* ІМВ Y-5023, яке дозволяє отримати як мінімум два цільових продукта: міцелій *P. ostreatus* і біомасу дріжджів.
- Встановлено, що на відміну від більшості інших каротинсинтезуючих організмів (таких як: водорості, бактерії, гриби, в т.ч. дріжджі), *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 можуть культивуватися в темряві, світло не являється стимулюючим фактором росту і каротиногенезу цих дріжджів.
- Показано, що освітленість впливала на кількісний склад каротиноїдних пігментів і не впливала на їх якісний склад. Вперше у складі каротиноїдних пігментів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 було виявлено атаксантин і показана можливість отримання лікопену, а також загальних каротиноїдів у великих кількостях у біомасі цих дріжджів - до 25 мг/г сухої маси.
- Встановлена відсутність прямої кореляції між вмістом глюкози та інших моносахаридів у середовищі культивування й накопиченням біомаси, а також показана наявність кореляції між вмістом у середовищах культивування таких олігосахаридів як три-, тетра-, пента- і гексасахаридів і вмістом каротиноїдів, зокрема, β -каротину та торулородину в біомасі *R. diobovatum* ІМВ Y-5023.

Практичне значення одержаних результатів полягає в тому, що:

- Розроблено способи культивування дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023, що дозволяють отримати біомасу із значним вмістом каротиноїдів.

- Розроблено спосіб послідовного культивування, який дозволяє не тільки збільшити вихід біомаси *R. diobovatum* ІМВ Y-5023, а й отримати два цільових продукта.
- Отримані результати досліджень дають змогу використання різних способів регуляції росту, синтезу каротиноїдних пігментів та їх якісного складу дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023.
- Показана можливість використання різних промислових відходів у якості живильних середовищ для культивування цих дріжджів та способи їх оптимізації.
- Показано, що *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 можуть бути використані як для отримання біомаси, так і для отримання каротиноїдів у біотехнологічному виробництві, з можливістю підвищення його рентабельності.

Результати роботи використовуються в освітньому процесі на кафедрі молекулярної біології та біотехнології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна у рамках спеціального курсу: «Об'єкти біотехнології» за спеціальністю «Молекулярна біологія та біотехнологія (Біологія)» для студентів 4-го курсу біологічного факультету за ОКР «Бакалавр», а також загального курсу біологічного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна «Біотехнологія». (Акт впровадження).

Особистий внесок здобувача. Самостійно була підібрана та проаналізована література за темою дисертації, здійснена постановка експериментів, вибір досліджуваних показників і статистична обробка частини результатів. Експерименти з визначення динаміки росту та виходу біомаси дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 за культивування на різних живильних середовищах, вмісту ліпідів, загального азоту, загального вуглецю в досліджуваних середовищах були проведені самостійно. Самостійно проведено роботу з підготовки зразків для визначення якісного та кількісного вмісту каротиноїдів у біомасі *R. diobovatum* ІМВ Y-5023, а також вуглеводного складу досліджуваних живильних середовищ методом високоефективної рідинної хроматографії суміщеної з мас-спектрометрією, а саме: екстракцію пігментів з клітин дріжджів та мікрофільтрацію живильних середовищ (відділення від білкових молекул).

Експерименти з визначення якісного та кількісного вмісту каротиноїдів у біомасі *R. diobovatum* ІМВ Y-5023, а також вуглеводного складу досліджуваних живильних середовищ методом високоефективної рідинної хроматографії суміщеної з мас-спектрометрією, а також статистична обробка деяких одержаних результатів були проведені спільно зі співробітниками відділу ферментації та біосинтезу Інституту харчових технологій рослинного походження Університету природничих наук у м. Познані (м. Познань, Польща).

Аналіз та інтерпретація отриманих результатів проведені разом з науковим керівником д.б.н., проф. Божковим А. І.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертації були представлені на конференціях всеукраїнського та міжнародного рівнів:

X Міжнародній науковій конференції студентів та молодих науковців «Шевченківська весна 2012: Біологічні науки» (Київ, 2012); IX Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2013); VI Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція.», присвяченій 150-річчю від дня народження видатного ботаніка В. І. Липського (Одеса, 2013); XIV міжнародній заочній науково-практичній конференції «Научная дискуссия: вопросы математики, физики, химии, биологии» (Москва, 2014); XI Українському біохімічному конгресі (Київ, 2014).

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 6 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та 5 додатків. Обсяг загального тексту дисертації складає 186 сторінок, з них основного тексту 152 сторінки. Робота ілюстрована 12 таблицями та 36 рисунками. Список використаних джерел містить 180 найменувань.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** подано загальну характеристику роботи, обґрунтовано її актуальність, сформульовано мету та завдання дослідження, визначено його об'єкт, предмет, методи, окреслено наукову новизну, практичну цінність отриманих результатів, зв'язок роботи з науковими програмами, наведено дані про апробацію та впровадження основних результатів дисертаційного дослідження.

У **першому розділі «Огляд літератури»** проводиться аналіз сучасного стану знань щодо біологічних особливостей каротиноносних дріжджів *Rhodosporidium diobovatum*, чинників, які впливають на ріст каротиноносних дріжджів, а також особливостей каротиногенезу дріжджів та механізмів його регуляції. Розглядаються сучасні проблеми біотехнологічних виробництв при отриманні біомаси та каротиноїдних пігментів дріжджів. На основі проведеного аналізу літературних джерел визначено актуальність власного дослідження.

У **другому розділі «Матеріали та методи»** наведено характеристику об'єктів та методів досліджень, викладено методики проведених експериментів.

Об'єкт дослідження - штам базидіоміцетових дріжджів *Rhodosporidium diobovatum* IMB Y-5023 було отримано з Депозитарію мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України.

Умови культивування штаму. Маточну культуру підтримували на агаризованому середовищі (26% сусла, 2% агару). Перед культивуванням у досліджуваних рідких середовищах отримували інокулят для подальшого культивування. Для цього культуру дріжджів переносили зі скошеного агару в рідкі досліджувані середовища (1 пробірку промивали 10 мл свіжого середовища й отриману суспензію вносили до 50-ти мл рідкого середовища в колби об'ємом 300 мл).

Дріжджі культивували на різних рідких живильних середовищах, синтетичних і натуральних:

Синтетичні:

- Середовище Рідера з 2% глюкозою як джерелом карбону (г/л) (NH_4NO_3 – 2; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; MgSO_4 – 0,75; KCl – 0,4; K_2HPO_4 – 0,1; KH_2PO_4 – 1; $\text{pH}=5,5$);

- Середовище YM (г/л) (глюкоза – 10, пептон – 5, мальтотріоза – 5, дріжджовий екстракт – 3, екстракту солоду – 25; $\text{pH}=5,0$);

Натуральні:

- Середовище CM (10% - й екстракт моркви, глюкоза – 10 г/л, пептон – 10 г/л, NaCl – 1 г/л; $\text{pH}=5,0$);

- Середовище BY (екстракт пшеничних висівок – 3%, дріжджовий екстракт – 1%. Отримували екстракт у результаті термічної обробки при $T=121^\circ\text{C}$ під тиском 1,5 атм., протягом 90 хвилин; $\text{pH}=6,8$);

- Середовище BYP (культуральне середовище міцеліального гриба *Pleurotus ostreatus* після 2, 8, 12 діб росту міцелію на середовищі BY, і після термічної обробки при $T=100^\circ\text{C}$, протягом 5 хвилин); $\text{pH}=5,0$;

- Середовище BYL (культуральне середовище міцеліального гриба *Lentinula edodes* після 2, 8, 12 діб росту міцелію на середовищі BY і після термічної обробки при $T=100^\circ\text{C}$, протягом 5 хвилин); $\text{pH} = 5,0$;

- Середовище CV - післяспиртова кукурудзяна барда (для культивування дріжджів також використовували кілька способів модифікації кукурудзяної барди: 1) змінення pH (в діапазоні від 3,4 до 7,0); 2) поділ на три фракції (верхня фракція – ВФ, середня фракція – СФ, нижня фракція – НФ), що містять механічні частинки і не містять)).

При послідовному культивуванні *P. ostreatus*, *L. edodes* → каротинсинтезуючі дріжджі, середовища BYP та BYL отримували внаслідок модифікації середовища BY. Для цього міцелій *P. ostreatus* та *L. edodes* (окремо) пересівали на середовище BY і культивували протягом 2, 8, 12 діб (до 300 мл середовища вносили 6,5 г зернового міцелію). Культивування міцелію проводили у колбах об'ємом 1000 мл. Після росту міцелій видаляли за допомогою фільтрування.

Дріжджі культивували протягом 3-6 діб при температурі 22°C , на орбітальній гойдалці при 150 об/хв., у колбах об'ємом 250 мл (об'єм середовища у колбі становив 50 мл, а об'єм інокуляту – 10 % від об'єму середовища, що засівалося).

Для визначення впливу інтенсивності освітленості на вихід біомаси й синтез каротиноїдів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 культивували на середовищах CM, YM, BY, BYP в різних режимах освітленості: 0 лк (у темряві), 300 лк, 750 лк, 2000. лк, 5000 лк протягом 5 діб.

Показники, що визначалися в процесі культивування. Для встановлення динаміки росту дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 кількість клітин дріжджів визначали одразу після внесення до культури та кожні 24 години

протягом 3-6 діб росту за допомогою камери Горяєва. Вихід сухої біомаси визначали після 5 діб росту ваговим методом.

Вміст каротиноїдів у клітинах дріжджів після попередньої екстракції, а також вміст моно- і олігосахаридів у культуральних середовищах до та після культивування дріжджів визначали методом високоефективної рідинної хроматографії суміщеної з мас-спектрометрією. Вміст загальних каротиноїдів у біомасі, вміст загальних ліпідів, загального вуглецю і загального азоту в середовищах культивування, визначали за допомогою спектрофотометричних методів. Усі отримані результати були статистично проаналізовані (програмний пакет Statistica версії 10 від StatSoft, Inc, OK, USA).

У третьому розділі «Ріст *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на різних живильних середовищах» досліджено динаміку росту та вихід біомаси дріжджів на синтетичних та натуральних живильних середовищах.

Встановлено, що за культивування *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на синтетичному середовищі Рідера відразу після внесення дріжджів у нього вихідна концентрація клітин складала менше 6 млн/мл середовища (рис. 1). При культивуванні дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на цьому живильному середовищі лаг-фаза тривала одну добу, після чого наставала фаза експоненціального росту, яка тривала майже дві доби, а вже після 72-х год росту наставала стаціонарна фаза росту (рис. 1). На шосту добу спостерігалось відмирання клітин, що виражалось у зменшенні кількості клітин у культурі (рис. 1). Максимальна концентрація клітин *R. diobovatum* ІМВ Y-5023, яка спостерігалась під час стаціонарної фази росту, збільшилась у 22,5 разів, порівняно з вихідною концентрацією.

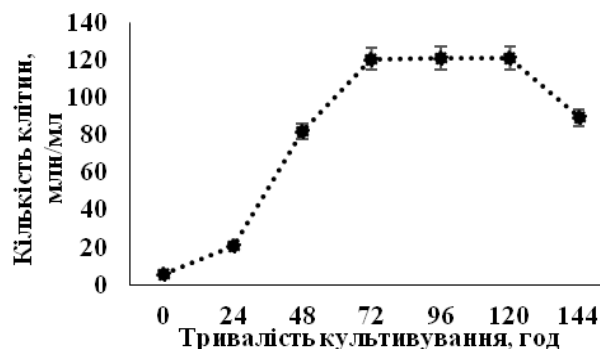


Рис. 1. Динаміка росту дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на синтетичному середовищі Рідера

Визначено, що за культивування дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на натуральному живильному середовищі ВУ (екстракті пшеничних висівків) стаціонарна фаза росту наставала після 72 год росту (рис. 2). На шосту добу культивування спостерігалось відмирання клітин (рис. 2). Концентрація клітин дріжджів при культивуванні на цьому живильному середовищі була значно вищою порівняно зі середовищем Рідера (майже у 4 рази) під час стаціонарної фази росту (рис. 1; 2).

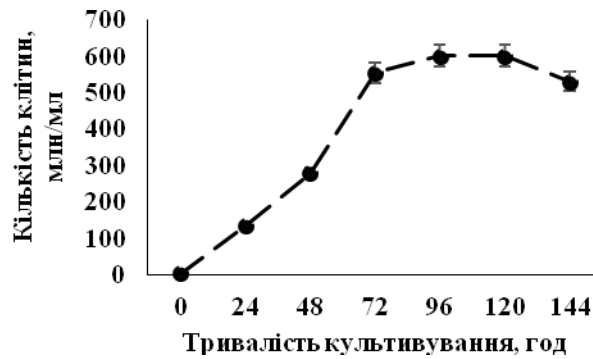


Рис. 2. Динаміка росту дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування на натуральному середовищі ВУ (екстракт пшеничних висівок)

Встановлено, що майже всі досліджувані натуральні живильні середовища, окрім середовища CV (кукурудзяної барди), забезпечували більш інтенсивний ріст та значно більший вихід біомаси *R. diobovatum* IMB Y-5023 у порівнянні з класичними синтетичними середовищами Рідера та YM (рис. 3). Найбільший вихід біомаси забезпечували живильні середовища ВУР та CM (рис. 3).

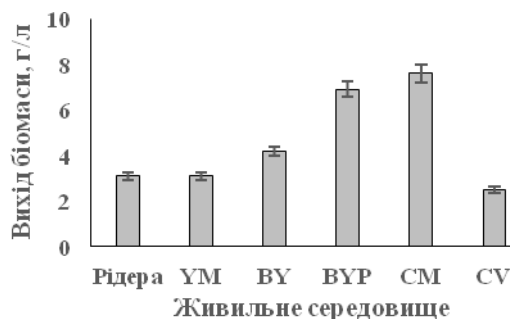


Рис. 3. Вихід сухої біомаси дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 після 5-ти діб росту на досліджуваних середовищах

Для біотехнологічного промислового процесу отримання біомаси та різних метаболітів дріжджів має велике значення тривалість культивування, що впливає на рентабельність виробництва і як наслідок на ціну цільового продукту. В результаті проведених нами досліджень, було встановлено, що для отримання максимального виходу біомаси, тривалість культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 у рідких культурах повинна тривати не більше 5 діб, оскільки у всіх випадках на 6-ту добу наставала стадія відмирання клітин у культурі.

У четвертому розділі «Послідовне культивування *P. ostreatus*, *L. edodes* → каротинсинтезуючі дріжджі» розроблено спосіб модифікації нестандартного натурального живильного середовища ВУ (екстракту пшеничних висівок) для подальшого культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023.

Хоча натуральне середовище ВУ забезпечувало кращий ріст та більший вихід біомаси дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023, ніж синтетичні середовища, з метою забезпечення ще більш інтенсивного росту на цьому натуральному

середовищі, було зроблено припущення про доцільність його біологічної модифікації. Оскільки до складу середовища ВУ (екстракту пшеничних висівок) входить велика кількість полімерів, у тому числі полісахаридів, які здебільшого погано засвоюються клітинами дріжджів, то можливо, що збагачення такого середовища моносахаридами та олігосахаридами завдяки біологічній модифікації, зможе дозволити забезпечити кращий ріст дріжджів. Суть біологічної модифікації цього природного живильного середовища полягала у послідовному культивуванні в ньому грибів з подальшим культивуванням дріжджів. Передбачалося, що короткострокове культивування базидіальних грибів *P. ostreatus* та *L. edodes*, зможе забезпечити розщеплення полісахаридів екстракту висівок до моносахаридів й олігосахаридів.

За культивування *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на середовищах після попереднього росту міцелію *P. ostreatus* на середовищі ВУ протягом 2, 8 або 12 діб, не було виявлено значного стимулюючого ефекту цих середовищ на ріст дріжджів (рис. 4).

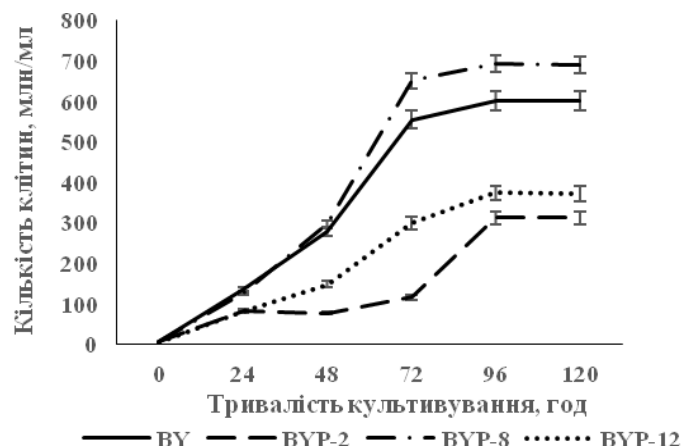


Рис. 4. Динаміка росту дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 за культивування на культуральних середовищах *P. ostreatus* різного віку:

ВУ - контроль - екстракт пшеничних висівок;

ВУР -2 - культуральне середовище *P. ostreatus* після 2 діб росту міцелію на середовищі ВУ;

ВУР -8 - культуральне середовище *P. ostreatus* після 8 діб росту міцелію на середовищі ВУ;

ВУР -12 - культуральне середовище *P. ostreatus* після 12 діб росту міцелію на середовищі ВУ

Культуральні середовища *L. edodes*, отримані в результаті культивування міцелію протягом 2, 8, 12 діб на контрольному середовищі ВУ (BYL-2, BYL-8, BYL-12), в усіх випадках пригнічували ріст дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023, у порівнянні з середовищем ВУ (рис. 5). Було встановлено, що ступінь пригнічення інтенсивності росту дріжджів залежить від тривалості культивування міцелію. Найбільший пригнічувальний ефект спостерігався у разі культивування дріжджів на культуральному середовищі *L. edodes* після 2 діб росту міцелію (рис. 5).

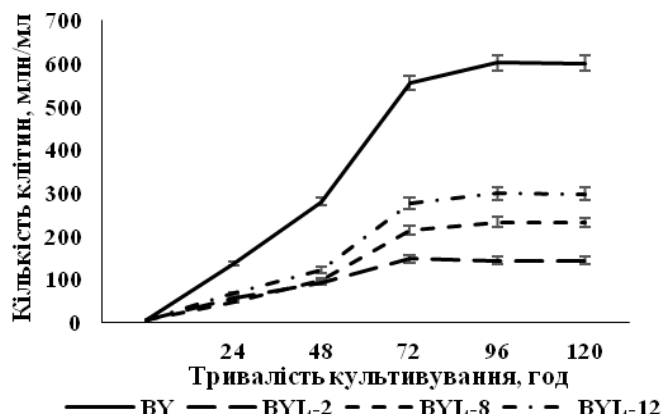


Рис. 5. Динаміка росту дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування на культуральних середовищах *L. edodes* різного віку:

BY - контроль - екстракт пшеничних висівок;

BYL -2 - культуральне середовище *L. edodes* після 2 діб росту міцелію на середовищі BY;

BYL -8 - культуральне середовище *L. edodes* після 8 діб росту міцелію на середовищі BY;

BYL -12 - культуральне середовище *L. edodes* після 12 діб росту міцелію на середовищі BY

Таким чином, культуральні середовища *P. ostreatus* та *L. edodes*, отримані внаслідок культивування міцелію цих грибів на контрольному середовищі BY, впливали по-різному на інтенсивність росту *R. diobovatum* IMB Y-5023, в залежності від тривалості культивування міцелію. Здебільшого, ці культуральні середовища пригнічували ріст дріжджів. Це може бути пов'язано з тим, що в процесі росту *P. ostreatus* та *L. edodes* екскретують у середовище компоненти, які володіють інгібуючою активністю по відношенню до *R. diobovatum* IMB Y-5023. Якщо ці компоненти термолабільні, то їх можна інактивувати за допомогою термічної обробки.

Встановлено, що термообробка (5 хвилин при 100° C) контрольного середовища BY супроводжувалася зниженням інтенсивності росту дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на 33% під час стаціонарної фази росту порівняно з цим же середовищем без термообробки (рис. 5; 6).

Короткострокова термічна обробка контрольного середовища BY приводила до зменшення інтенсивності росту дріжджів, а термообробка середовищ BYP після 2-12 діб культивування *P. ostreatus* значно збільшувала інтенсивність росту *R. diobovatum* IMB Y-5023 (рис. 6). Ці результати можуть свідчити про інактивацію компонентів, які були екскретовані у середовище міцелієм *P. ostreatus* й пригнічували ріст дріжджів, та збільшення доступності компонентів живильного середовища для засвоєння клітинами *R. diobovatum* IMB Y-5023. На середовищі BYP-2 після термічної обробки кількість клітин дріжджів під час стаціонарної фази росту була на 69% більшою, ніж на тому ж середовищі без термообробки, й значно більшою, ніж на контрольному середовищі BY (рис. 4; 6).

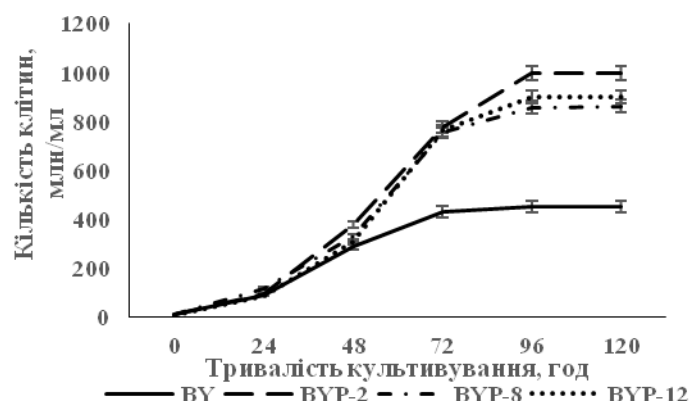


Рис. 6. Динаміка росту дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування на контрольному середовищі (ВУ), на тому ж середовищі після культивування *P. ostreatus* протягом 2, 8 та 12 діб (ВУР-2, ВУР-8 та ВУР-12) та після 5 хвилин термічної обробки (100° C) цих середовищ

Визначено, що усі три живильні середовища ВУЛ-2, ВУЛ-8, ВУЛ-12 після термічної обробки значно пригнічували ріст дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 у порівнянні з контрольним середовищем ВУ без термічної обробки та після його термічної обробки.

Таким чином, результати проведених досліджень показали, що попереднє культивування міцелію *P. ostreatus* протягом 2-х діб та короткострокова термічна обробка модифікують середовище ВУ, що супроводжувалось збільшенням виходу біомаси дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 майже на 40% порівняно з вихідним середовищем ВУ.

Встановлено, що склад контрольного живильного середовища ВУ істотно змінився після культивування міцелію *P. ostreatus* протягом 2-х діб та термічної обробки протягом 5 хвилин. Вміст золи зменшився на 26%, а вміст жирів був зменшений у 2,4 рази порівняно з вихідним середовищем (табл. 1). Також культивування *P. ostreatus* протягом 2-х діб та термічна обробка середовища супроводжувалися зменшенням загального азоту і протеїну на 23% (табл. 1). Вміст кальцію і фосфору достовірно не змінювався. При цьому вміст безазотистих екстрактивних речовин (БЕР) збільшувався на 23% порівняно з контрольним середовищем ВУ (табл. 1). Як відомо, до складу БЕР входять моно-, ди-, трисахариди, крохмаль, глікоген, частина пектинових речовин і геміцелюлоз, камеді та органічних кислот.

Таблиця 1

Склад живильних середовищ - контрольного (ВУ) та після 2 діб культивування *P. ostreatus* на контрольному середовищі й після 5 хвилин термічної обробки (ВУР), у відсотках (%)

Середовище	Зола	Жир сирий	Загальний азот	Загальний протеїн	БЕР	Кальцій	Фосфор
ВУ	15,5±0,8	1,6±0,08	5,9±0,3	36,9±1,8	45,9±2,1	0,27±0,01	2,6±0,1
ВУР	11,4±0,5	0,7±0,03	4,6±0,2	28,6±1,4	59,4±2,7	0,24±0,01	2,3±0,1

Визначення вмісту загальних моно- і олігосахаридів показало, що їх кількість збільшилася в 3,5 рази після культивування *P. ostreatus* й термічної обробки. Аналіз індивідуальних компонентів показав, що 2-х добове культивування *P. ostreatus* на контрольному середовищі протягом 2 діб супроводжувалося значним збільшенням насамперед глюкози в 278,5 разів, пентосахаридів у 13,7 разів, трисахаридів у 3,2 рази, у той час як вміст фруктози зменшився в 1,7 рази в порівнянні з її вмістом у контрольному середовищі (табл. 2).

Таблиця 2

Вміст низькомолекулярних цукрів (мкг/мл) у контрольному середовищі (ВУ) та в середовищі після 2 діб культивування *P. ostreatus* на контрольному середовищі й після 5 хвилин термічної обробки (ВУР)

Вміст цукрів, мкг/мл	Досліджуване середовище	
	ВУ	ВУР
Дисахариди	160,74±5,7	163,88±6,0
Трисахариди	2870,95±49,2	9249,89±67,3
Тетрасахариди	134,29±4,3	1325,81±21,8
Пентасахариди	6,04±0,3	82,74±3,5
Гексасахариди	0,91±0,04	4,46±0,2
Рабіноза	0	0
Фруктоза	1,87±0,09	1,04±0,05
Галактоза	0	0
Глюкоза	1,19±0,05	331,38±7,6
Рибоза	0	0
Ксилоза	0	0
Всього	3175,98±51,1	11159,19±97,6

У п'ятому розділі «Використання промислових відходів у якості субстратів для культивування дріжджів *R. diobovatum* ІМВ У-5023» досліджено можливі способи оптимізації живильного середовища СВ (кукурудзяної барди, яку отримують у виробництві спирту) для подальшого ефективного використання в культивуванні дріжджів *R. diobovatum* ІМВ У-5023.

Визначено оптимальне значення рН кукурудзяної барди для росту *R. diobovatum* ІМВ У-5023. При рН = 5,0 - 6,5 вихід біомаси дріжджів був на 34 % більшим порівняно з вихідним середовищем, а при рН = 7,0 вихід біомаси знижувався на 28 % порівняно з культивуванням при рН = 5,0 (рис. 7).

Оскільки барда гетерогенна за складом та містить велику кількість ліпідів, її розділяли на 3 складові фракції. Верхня легка фракція (ВФ) не містила механічних частинок, середня фракція (СФ) містила багато дрібних механічних залишків із зерна кукурудзи, а нижня важка фракція (НФ) являла собою великі механічні частинки у великій кількості. Динаміка росту дріжджів на цих трьох фракціях була різною (рис. 8).

Кількість клітин дріжджів за 2 доби культивування на НФ збільшувалася в 5 разів у порівнянні з вихідною кількістю й надалі залишалася майже незмінною (рис. 8А).

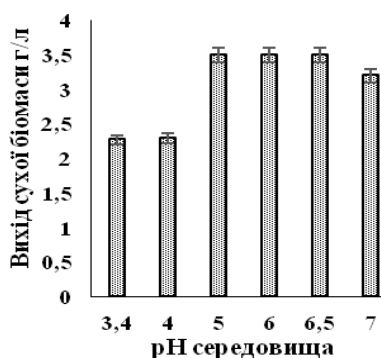


Рис. 7. Вихід сухої біомаси дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 за їх культивування на кукурудзяній барді при значеннях рН від 3,4 до 7,0

Набагато краще дріжджі росли на СФ. Після 3 діб культивування кількість клітин *R. diobovatum* IMB Y-5023 на цій фракції збільшувалася в 17,2 рази (рис. 8А).

Однак, найкраще культура *R. diobovatum* IMB Y-5023 росла на ВФ. Кількість клітин вже через добу культивування була в 16 разів більшою, ніж вихідна кількість, а на 2 і 3 добу росту в 63 і 77 разів, відповідно, більшою, що відповідало кількості клітин на середовищі ВУ (рис. 8А).

Про різну інтенсивність росту *R. diobovatum* IMB Y-5023 на різних фракціях кукурудзяної барди свідчить також й вихід сухої біомаси дріжджів на 3 добу культивування (рис. 8Б).

Необхідно зазначити, що вихід сухої біомаси дріжджів за їх культивування на ВФ кукурудзяної барди після видалення механічних частинок і доведення рН до 5,0 - 6,5 був майже таким же, як і на екстракті пшеничних висівок (ВУ), і становив 4,5 - 5,0 г/л сухих дріжджів за 3 доби росту (рис. 8Б).

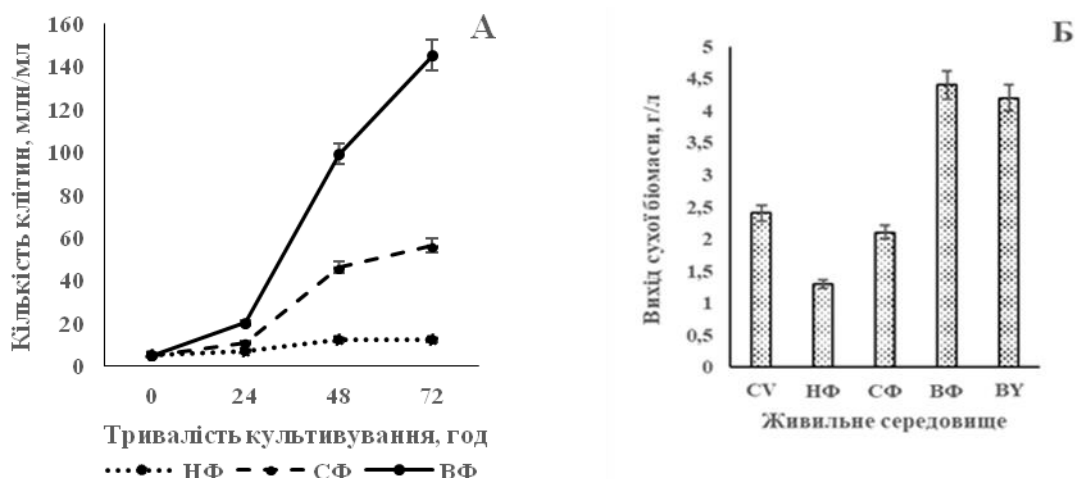


Рис. 8. Динаміка росту дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на різних фракціях кукурудзяної барди (А) та вихід сухої біомаси дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування на вихідному середовищі (CV), на різних фракціях кукурудзяної барди та на екстракті пшеничних висівок (ВУ) після 3 діб росту (Б)

Визначено вміст загальних ліпідів у 3-х досліджуваних фракціях барди. Виявлено, що найбільша кількість ліпідів містилася у ВФ і їх вміст становив 334 мг/мл, а в середній (СФ) і нижній фракціях (НФ) у 3 та 2,2 рази менше.

Таким чином, дріжджі *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 можуть рости на середовищах, у складі яких міститься багато ліпідів, і кукурудзяна барда після її попередньої оптимізації (її поділ шляхом флотації або сепарування, а також доведенням рН до 5-6,5) може бути використана для промислового виробництва біомаси цих дріжджів. Розглянуті способи оптимізації кукурудзяної барди дозволяють значно збільшити вихід біомаси *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 порівняно з вихідною бардою (рис. 8Б).

У шостому розділі «Каротиногенез дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023» досліджено вплив видимого світла різної інтенсивності та складу трьох різних живильних середовищ на накопичення біомаси й синтез каротиноїдних пігментів дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023.

Визначено склад та кількість каротиноїдних пігментів у біомасі *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 після 5 діб культивування на досліджуваних синтетичних та натуральних живильних середовищах у темряві. Встановлено, що за культивування дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на синтетичному середовищі Рідера після 120 годин росту у темряві загальний вміст пігментів становив 3,7 мг/г біомаси (табл. 3). Більша частина каротеноїдів приходилася на лікопен й становила 75,1%, астаксантин становив 1,6 % від загальної кількості каротиноїдів, решта припадала на β -каротин (табл. 3).

У разі культивування дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на синтетичному середовищі YМ після 120 годин росту у темряві загальний вміст каротеноїдів був у 6,75 разів більшим, ніж на середовищі Рідера (табл. 3). Аналіз пігментного складу каротиноїдів у біомасі *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 після 5 діб росту на середовищі YМ дозволив виявити 4 пігменти: лікопен, β -каротин, астаксантин і торулоридин. На лікопен доводилося 55,5%, β -каротин - 38,1%, торулоридин - 5,6% і 0,8% на астаксантин від загального вмісту (табл. 3).

У разі культивування дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на натуральному середовищі СМ після 120 годин росту у темряві загальний вміст каротеноїдів був у 1,5 більшим, ніж на середовищі ВУР та майже у 2,8 разів більшим, ніж на середовищі ВУ (табл. 3, 4).

Таблиця 3

Склад та кількість каротиноїдних пігментів у біомасі дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 після 5 діб культивування на досліджуваних живильних середовищах у темряві, (мг/г сухої б /м;)

Живильне середовище	β -каротин	Астаксантин	Лікопен	Торулоридин	Вміст загальних каротиноїдів
Рідера	0,86 \pm 0,04	0,06 \pm 0,003	2,78 \pm 0,13	0,00	3,7 \pm 0,15
YМ	9,51 \pm 0,07	0,21 \pm 0,01	13,86 \pm 0,56	1,42 \pm 0,02	24,98 \pm 0,92
СМ	0,78 \pm 0,02	0,1 \pm 0,01	4,13 \pm 0,15	0,00	4,99 \pm 0,18

Таблиця 4

Вміст каротиноїдів у сухій біомасі дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023
(мг/г с/б; $M \pm m$; $n=5$)

Живильне середовище	Тривалість культивування, години	β -каротин	Астаксантин	Лікопен
ВУ	48	$0,1 \pm 0,005$	$0,01 \pm 0,0005$	$0,8 \pm 0,04$
	72	$0,2 \pm 0,01$	$0,015 \pm 0,0007$	$1,0 \pm 0,05$
	96	$0,34 \pm 0,017$	$0,02 \pm 0,001$	$1,14 \pm 0,05$
	120	$0,9 \pm 0,045$	$0,02 \pm 0,001$	$0,88 \pm 0,04$
ВУР	48	$0,4 \pm 0,02$	$0,01 \pm 0,0005$	$1,7 \pm 0,08$
	72	$0,81 \pm 0,04$	$0,02 \pm 0,001$	$2,08 \pm 0,1$
	96	$1,1 \pm 0,05$	$0,03 \pm 0,001$	$1,87 \pm 0,09$
	120	$1,64 \pm 0,08$	$0,05 \pm 0,002$	$1,66 \pm 0,08$

Аналіз профільного складу пігментів після культивування на середовищі СМ показав, що у біомасі дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 містилися три пігменти, як і у випадку культивування на середовищах ВУ та ВУР, при цьому на лікопен доводилося 82,4%, на β -каротин тільки 15,6%, вміст астаксантину становив 2% від загальних каротиноїдів, а торулородин не був виявлений (табл. 3; 4).

Показано, що у разі культивування дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на всіх п'яти досліджуваних живильних середовищах синтетичних та натуральних, після 5 діб росту у темряві найбільша кількість загальних каротиноїдних пігментів була виявлена на синтетичному середовищі УМ, якісний склад пігментів на цьому середовищі теж відрізнявся від усіх інших середовищ. Таким чином, вміст та склад каротиноїдів залежать від середовища культивування.

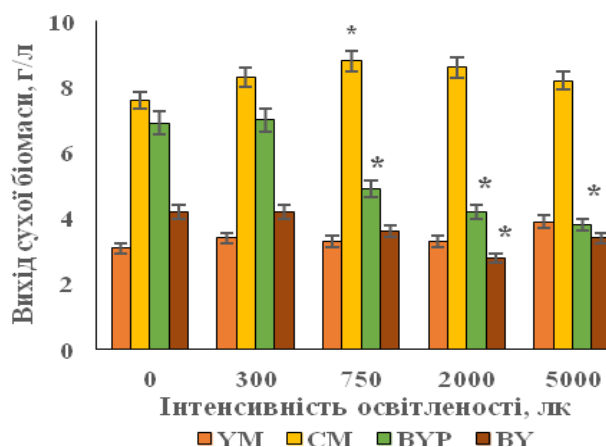


Рис. 9. Вихід сухої біомаси дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 за культивування на досліджуваних живильних середовищах протягом 5 діб при різній інтенсивності освітленості в діапазоні від 300 до 5000 лк (*- позначені показники при $P < 0,05$ порівняно з показниками за культивування у темряві)

Досліджено вплив видимого світла різної інтенсивності на накопичення біомаси та синтез каротиноїдних пігментів дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023

за культивування на досліджуваних живильних середовищах. Виявлено, що інтенсивність освітленості в діапазоні від 300 до 5000 лк по-різному впливала на вихід сухої біомаси дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування на досліджуваних середовищах (рис. 9). Вона пригнічувала, стимулювала або не впливала на накопичення біомаси *R. diobovatum* IMB Y-5023 в залежності від середовища культивування (рис. 9).

Загальний вміст каротиноїдних пігментів визначали у біомасі *R. diobovatum* IMB Y-5023 після 5 діб культивування при різній інтенсивності освітленості на досліджуваних середовищах УМ, ВУР, СМ. Встановлено, що освітленість спричиняла різний вплив на загальний вміст каротиноїдів у клітинах *R. diobovatum* IMB Y-5023, зростаючих на середовищах УМ, ВУР, СМ (рис. 10).

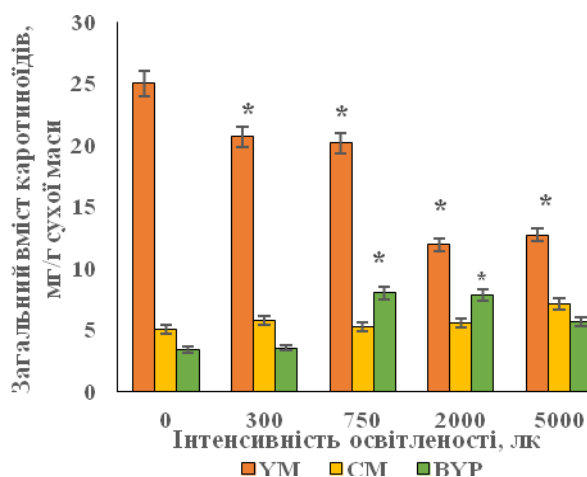


Рис. 10. Загальний вміст каротиноїдних пігментів у біомасі дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування на досліджуваних живильних середовищах протягом 5 діб при різній інтенсивності освітленості в діапазоні від 300 до 5000 лк (*- позначені показники при $P < 0,05$ порівняно з показниками за культивування у темряві)

Освітленість інтенсивністю в діапазоні від 300 до 5000 лк впливала на загальний вміст каротиноїдних пігментів у клітинах *R. diobovatum* IMB Y-5023 по-різному, в залежності від середовища культивування, й це не було пов'язано з накопиченням біомаси в культурі дріжджів.

Визначено якісний склад каротиноїдних пігментів у біомасі дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування на досліджуваних живильних середовищах при різній інтенсивності освітленості в діапазоні від 300 до 5000 лк. Встановлено, що за культивування дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023 на досліджуваних живильних середовищах УМ, ВУР та СМ освітленість не впливала на якісний склад каротиноїдних пігментів у біомасі (рис. 11).

Кількісне співвідношення пігментів у клітинах *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування на досліджуваних живильних середовищах значно змінювалось в залежності від інтенсивності освітленості.

У результаті проведених досліджень було встановлено, що дріжджі *R. diobovatum* IMB Y-5023 ефективно синтезували каротиноїди в широкому

діапазоні інтенсивності освітленості, в тому числі й у темряві, незалежно від живильного середовища. Найбільшу кількість пігментів отримували в культурах за культивування *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на середовищі YМ, збагаченого олігосахаридами, незалежно від інтенсивності освітленості. Найбільший вихід каротиноїдів (24,98 мг/г сухої біомаси) був отриманий за культивування дріжджів на цьому середовищі в темряві. На сьогоднішній день це найбільший вихід пігментів, отриманий для дріжджів *R. diobovatum*. Таким чином, можна зробити висновок, що в проведених дослідженнях каротиногенез *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 залежав від складу живильного середовища та, ймовірно, переважно від вихідної концентрації вуглеводів у середовищі.

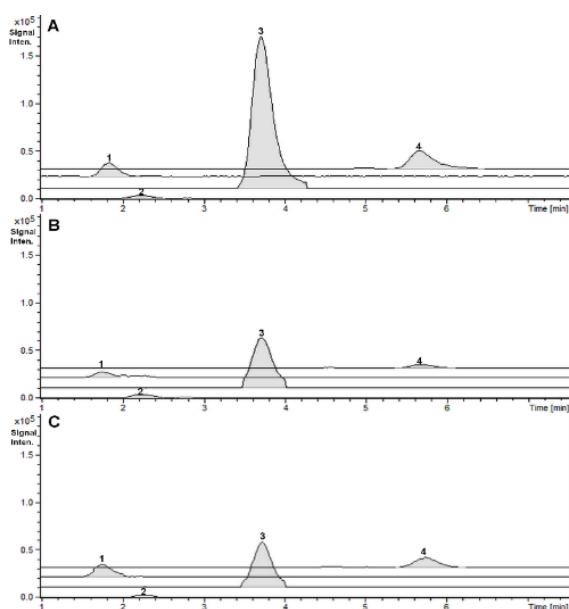


Рис. 11. Хроматограма каротиноїдного профілю, який визначали в біомасі дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 за культивування на досліджуваних живильних середовищах при інтенсивності освітленості 750 лк: А – на середовищі YМ, В – на середовищі СМ, С – на середовищі ВУР-Т; 1^й пік – астаксантин ($[M]^{+} = 596.386 \text{ m/z}$; $[M + H]^{+} = 597.394 \text{ m/z}$), 2^й пік – торулородин ($[M]^{+} = 564,396 \text{ m/z}$); 3^й пік – лікопен ($[M + H]^{+} = 537.446 \text{ m/z}$), 4^й пік - β -каротин ($[M]^{+} = 536,438 \text{ m/z}$).

Оскільки за культивування на середовищах YМ, ВУР та СМ освітленість інтенсивністю в діапазоні від 300 до 5000 лк у більшості випадків не впливала на ріст та синтез каротиноїдних пігментів дріжджів або пригнічувала їх, то звідси слідує, що культивування *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 можна здійснювати в темряві.

Досліджено вплив складу досліджуваних живильних середовищ на ріст та синтез каротиноїдів дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023. Загальний вміст вуглеводів у трьох досліджуваних живильних середовищах був різним. Таким чином, середовище YМ містило в три рази більше цукрів, ніж середовище СМ, і в 4 рази більше, ніж середовище ВУР (табл. 5). Визначення вихідного вмісту моно- та олігосахаридів у середовищах до внесення культури дріжджів показало, що всі три середовища не містили ксилози, рибози, арабінози та

галактози (табл. 5). Склад цукрів у середовищі УМ був досить різноманітним й містив велику кількість трисахаридів (68,3%) та глюкози (22%), а також дисахариди, тетрасахариди, пента- та гексасахариди в невеликих кількостях (табл. 5). У середовищі ВУР містилося кілька моносахаридів: глюкоза (2,95%) та фруктоза (0,09%). Більша частина цукрів була представлена трисахаридами (82,9%) і тетрасахаридами (11,9%) (табл. 8). Живильне середовище СМ виявилось досить однорідним у своєму складі, й у більшості містило моносахариди глюкозу (66,5%) та фруктозу (14,4% від загальної кількості цукрів), а також дисахариди (18%) (табл. 5).

Таблиця 5

Вміст моно- та олігосахаридів у вихідних досліджуваних живильних середовищах до культивування дріжджів *R. diobovatum* ІМВ У-5023, г / л

Вміст цукрів*, г/л	Досліджуване середовище		
	УМ	СМ	ВУР
ДП2	1,30±0,06	2,83±0,14	0,16±0,01
ДП3	32,33±1,61	0,04±0,00	9,25±0,43
ДП4	2,96±0,14	Сліди	1,33±0,06
ДП5	0,11±0,00	0,00	0,08±0,00
ДП6	Сліди	0,00	0,01±0,00
Арабіноза	0,00	0,00	0,00
Фруктоза	Сліди	2,17±0,10	Сліди
Галактоза	0,00	0,00	0,00
Глюкоза	10,60±0,53	10,00±0,47	0,33±0,01
Рибоза	0,00	0,00	0,00
Ксилоза	0,00	0,00	0,00
Всього	47,30±2,35	15,04±0,72	11,16±0,51

*ДП2 - дисахариди; ДП3 - трисахариди; ДП4 - тетрасахариди; ДП5 - пентасахариди; ДП6 - гексасахариди.

Освітленість інтенсивністю 300-5000 лк майже не впливала на споживання різних фракцій цукрів клітинами *R. diobovatum* ІМВ У-5023 на досліджуваних живильних середовищах порівняно з аналогічним культивуванням у темряві.

Встановлено початкове співвідношення вуглецево-азотного балансу С/Н у досліджуваних середовищах. Для середовища УМ воно становило 12, для середовища ВУР – 10, а для середовища СМ - 0,86.

Проведено багатовимірний аналіз результатів. Кластерний аналіз (КА) та метод головних компонент (МГК) були застосовані для того, щоб проілюструвати загальний взаємозв'язок між цукрами, що містилися у досліджуваних живильних середовищах, біомасою та каротиноїдами після 5 діб культивування дріжджів *R. diobovatum* ІМВ У-5023 на досліджуваних живильних середовищах.

Подібність між зразками згідно з параметрами, наведеними у таблиці 5 та на рисунках 12, 13 була досліджена як результат КА (рис. 12).

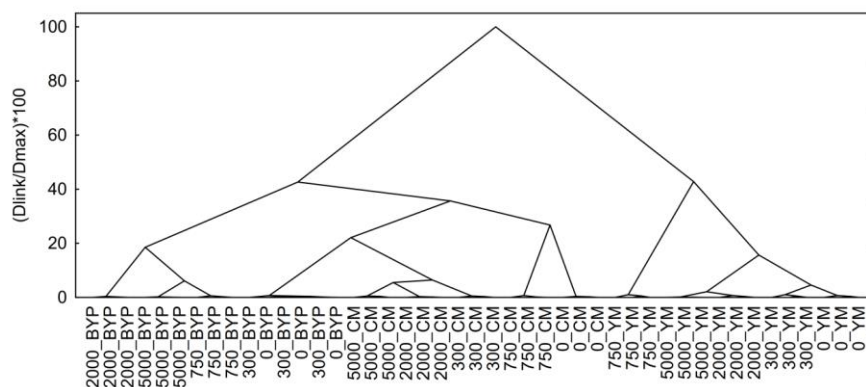


Рис. 12. Результати кластерного аналізу, подібність *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 після 5-денного культивування на середовищах YM, BYP, CM при різних інтенсивності освітленості (0-5000 лк) за параметрами, наведеними у табл. 5 та на рис. 12, 13. Правило об'єднання: метод Варда, метрика відстані: евклідові відстані (віддалі між двома точками)

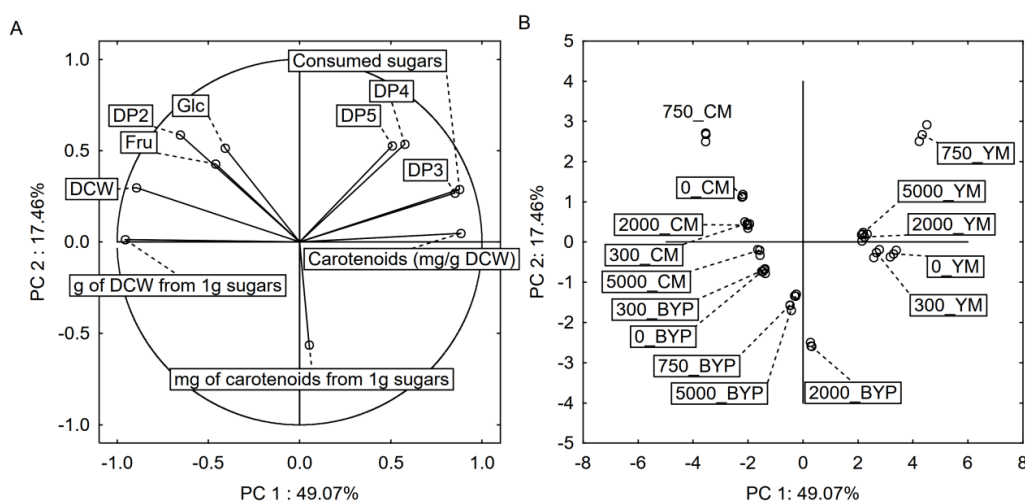


Рис. 13. Графік, що відображає МГК завантаженого графіка (а) та графіка оцінки (б) для зразків, отриманих з культур *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 після культивування на живильних середовищах YM, CM та BYP при різних інтенсивності освітленості (лк) (0; 300, 750, 2000 і 5000), за параметрами, наведеними у табл. 5 та на рис. 13, 14.

Параметри дріжджів були абсолютно іншими на середовищі YM порівняно з середовищами BYP та CM. Підсумовуючи можна зробити висновок, що середовища BYP та CM мали подібний вплив на *R. diobovatum* ІМВ Y-5023. Результати МГК (рис. 13) дозволяють спостерігати залежність між змінними та їх впливом на конкретні зразки. Зрозуміло, що найвища концентрація каротиноїдів була пов'язана з високим рівнем споживання цукру. Однак перетворення спожитих цукрів у біомасу було найбільш ефективним за культивування дріжджів на середовищі CM, але ефективність перетворення спожитих цукрів у каротиноїди була найвищою на середовищі BYP при високій інтенсивності освітлення.

ВИСНОВКИ

Досліджено особливості росту й каротиногенезу дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023, а також розроблено такі способи їх культивування, що дозволяють отримувати високий вихід біомаси та каротиноїдних пігментів даного продуценту з використанням живильних середовищ із низьким вмістом моносахаридів за культивування у темряві.

1. Натуральні живильні середовища забезпечували більш інтенсивний ріст дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 порівняно зі стандартними синтетичними середовищами. Максимальний вихід біомаси (7 - 8,8 г/л сухої маси) дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 отримано на натуральних живильних середовищах, таких як: морквяний екстракт і екстракт пшеничних висівок після попереднього культивування *P. ostreatus*.

2. Для отримання максимальної кількості цільових продуктів тривалість культивування *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 повинна становити не менше 120 годин, незалежно від середовища.

3. Попереднє короткострокове (2 доби) культивування *P. ostreatus* на екстракті пшеничних висівок супроводжується зміною складу середовища. Така зміна складу середовища супроводжувалась пригніченням росту дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на цьому середовищі. Короткочасне (5 хв) прогрівання до 100° С модифікованого *P. ostreatus* середовища забезпечувало значно кращий ріст дріжджів на такому середовищі зі збільшенням виходу біомаси як мінімум на 40%. Для модифікованого *P. ostreatus* середовища було характерне багаторазове (у 278 разів) збільшення вмісту глюкози та інших низькомолекулярних цукрів.

4. Дріжджі *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 можуть рости на середовищах, до складу яких входить велика кількість ліпідів (300-350 мг/мл). Кукурудзяна барда після її попередньої підготовки (поділ шляхом флотації або сепарування, а також доведення рН до 5-6,5) може бути використана для промислового виробництва біомаси дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023, що містить каротиноїди та інші біологічно активні речовини.

5. Найбільший вихід каротиноїдів (24,98 мг/г сухої біомаси) був отриманий на синтетичному середовищі YМ. Між виходом біомаси дріжджів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 на різних живильних середовищах у темряві і накопиченням каротиноїдів у їх клітинах не було виявлено прямої залежності. Встановлено, що склад каротиноїдних пігментів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 залежить від складу живильного середовища. Серед каротиноїдів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 виявлені: лікопен, β -каротин, астаксантин, торулородин.

6. Вперше встановлено, що культивування *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 можна здійснювати в темряві. Освітленість надавала різний ефект на накопичення біомаси дріжджів і вміст каротиноїдів у ній, в залежності від середовища культивування: впливала на кількісний склад каротиноїдних пігментів *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 і не чинила впливу на їх якісний склад.

7. Дріжджі *R. diobovatum* ІМВ Y-5023 здатні рости на середовищах з низьким вмістом глюкози (0,33 г/л). Виявлено відсутність прямої кореляції або

наявність зворотної кореляції між кількістю спожитої глюкози і виходом біомаси на досліджуваних живильних середовищах. Найбільша ефективність перетворення спожитих цукрів у біомасу за культивування в темряві спостерігалася на середовищі ВУР.

8. Склад цукрів у середовищі культивування визначає метаболічну спрямованість дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023. Встановлено наявність кореляції між різними фракціями спожитих цукрів і досліджуваними параметрами: на середовищі СМ пряма кореляція була виявлена між лікопеном і кількістю спожитої фруктози ($r_s=0,9$); на середовищах УМ і ВУР така кореляція спостерігалася між β -каротином і кількістю спожитих дисахаридів, тетрасахаридів і пентасахаридів, а також між лікопеном і кількістю спожитих пентасахаридів. На середовищі УМ виявлена пряма кореляція між вмістом торулородину і кількістю спожитих дисахаридів, тетрасахаридів, пентасахаридів і гексасахаридів ($r_s=0,8$).

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Єльчіщева Ю.**, Голтвянський А. Ріст і вміст каротиноїдів дріжджів *Rhodosporidium diobovatum* IMB Y-5023 на натуральних і синтетичних живильних середовищах // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2015. № 70. С. 221–229. *Особистий внесок здобувача: проведено основний обсяг пошукової роботи, одержано експериментальні дані з впливу використаних живильних середовищ на динаміку росту, вихід біомаси та каротиноїдів дріжджів Rh. diobovatum IMB Y-5023, проаналізовано отримані дані та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали статті до друку.*

2. Goltvianskiy A., **Ielchishcheva Iu.**, Stachowiak B., Szwengiel A., Bozhkov A. Preculture of *Pleurotus ostreatus* Increases the Yield of Yeast Biomass // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2015. Vol. 4, № 3, P. 124-133. (Index Copernicus, CiteFactor, OAJI, CAS, Universitätsbibliothek Leipzig тощо). *Особистий внесок здобувача: проведено основний обсяг пошукової роботи, одержано експериментальні дані з впливу використаних живильних середовищ на динаміку росту, вихід біомаси дріжджів, підготовлено зразки живильних середовищ до аналізу їх складу, проаналізовано отримані дані та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали статті до друку.*

3. **Ielchishcheva Iu.**, Bozhkov A., Goltvianskiy A., Kurguzova N. The Effect of Lipid Components of Corn Vinasse on the Growth Intensity of Yeast *Rhodosporidium diobovatum* IMB Y-5023 // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2016. Vol. 5, №10. P. 467-477. (Index Copernicus, CiteFactor, OAJI, CAS, Universitätsbibliothek Leipzig тощо). *Особистий внесок здобувача: проведено основний обсяг пошукової роботи, одержано експериментальні дані з впливу використаних живильних середовищ на динаміку росту, вихід біомаси дріжджів Rhodospordidium diobovatum IMB Y-5023, а також розроблено способи оптимізації кукурудзяної барди, проаналізовано отримані дані та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали статті до друку.*

4. **Ielchishcheva Iu.**, Stachowiak B., Szwengiel A., Bozhkov A. Carbohydrate components of culture media as determinants of the *Rhodosporidium diobovatum* IMB Y-5023 yeast metabolism // Nauka Przyroda Technologie. 2017. Vol. 11, № 3.

P. 291–303. (Index Copernicus, Agro, Arianta, CABI, DOAJ, EBSCO). *Особистий внесок здобувача: проведено основний обсяг пошукової роботи, одержано експериментальні дані з впливу використаних живильних середовищ на вихід біомаси та каротиноїдів дріжджів *Rhodospiridium diobovatum* IMB Y-5023, підготовлено зразки живильних середовищ до аналізу їх вуглеводного складу, розраховано коефіцієнт ефективності перетворення субстрату на біомасу та каротиноїди, проаналізовано отримані дані та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали статті до друку.*

5. **Ielchishcheva Iu.**, Stachowiak B., Szwengiel A., Bozhkov A. Growth and carotenogenesis in *Rhodospiridium diobovatum* IMB Y-5023: effects of culture medium and illumination intensity // *FEMS Microbiology Letters*. 2018. Vol. 365, № 1. P. 1-8. (Web of Science, Scopus тощо; Impact Factor: 1,765). *Особистий внесок здобувача: одержано експериментальні дані з впливу використаних живильних середовищ та освітленості різної інтенсивності на вихід біомаси та каротиноїдів дріжджів *Rhodospiridium diobovatum* IMB Y-5023, підготовлено зразки біомаси дріжджів до аналізу їх пігментного складу, проаналізовано отримані дані та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали статті до друку.*

6. **Ельчищева Ю.В.**, Кургузова Н.И. Влияние липидных компонентов кукурузной барды на особенности роста и накопление биомассы дрожжей штамма *Rhodospiridium diobovatum* // «Шевченківська весна 2012: Біологічні науки»: матеріали X Міжнародної наукової конференції студентів та молодих науковців, 19-23 березня 2012 р. Київ, 2012. С. 107-108. *Особистий внесок здобувача: одержано експериментальні дані, проаналізовано отримані дані та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали до друку.*

7. Голтвянський А., **Єльчищева Ю.** Оцінка ефекту стимуляції інтенсивності росту дріжджів *Rhodospiridium diobovatum* продуктами життєдіяльності базидіоміцетів *Pleurotus ostreatus* та *Lentinula edodes* // Молодь і поступ біології: збірник тез IX Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів, приуроченої до 150-річчя від дня народження академіка В. Вернадського, 16-19 квітня 2013 р. Львів, 2013. С. 154-155. *Особистий внесок здобувача: одержано експериментальні дані, проаналізовано отримані дані та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали до друку.*

8. **Ельчищева Ю.В.**, Голтвянский А.В. Характеристика роста и биомассы мицелия *Pleurotus ostreatus* (JACQ.) P. KUMMER в жидких культурах // Матеріали VI Міжнародної наукової конференції молодих вчених «Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція.», присвяченої 150-річчю від дня народження видатного ботаніка В. І. Липського, 13-17 травня 2013 р. Одеса, 2013. С. 271-272. *Особистий внесок здобувача: одержано експериментальні дані, проаналізовано отримані дані та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали до друку.*

9. **Ельчищева Ю.В.**, Голтвянский А.В. Оптимизация питательной среды для культивирования дрожжей *Rhodospiridium diobovatum* // *Ukrainian biochemical journal*: матеріали XI Українського біохімічного конгресу, 6-10 жовтня 2014 р. Київ, 2014. Vol. 86, № 5 (2). P. 192-193. *Особистий внесок здобувача: одержано експериментальні дані, проаналізовано отримані дані та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали до друку.*

10. **Ельчищева Ю.В.**, Голтвянский А.В. Влияние экзометаболитов базидиомицета *Pleurotus ostreatus*, полученных в жидкой культуре, на

интенсивность роста дрожжей *Rhodospiridium diobovatum* // Научная дискуссия: вопросы математики, физики, химии, биологии. Сборник статей по материалам XIV международной заочной научно-практической конференции. 2014. №2 (14). С. 107-114. *Особистий внесок здобувача: проведено основний обсяг пошукової роботи, одержано експериментальні дані з впливу використаних живильних середовищ на динаміку росту дріжджів Rh. diobovatum IMB Y-5023, проаналізовано отримані дані та зроблено статистичні розрахунки, підготовлено матеріали статті до друку.*

АНОТАЦІЯ

Єльчищева Ю. В. Розробка способів культивування каротиноносних дріжджів *Rhodospiridium diobovatum* IMB Y-5023. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України, Київ, 2018.

Дисертація присвячена розробці таких способів культивування дріжджів *Rhodospiridium diobovatum* IMB Y-5023, що дозволять отримати високий вихід біомаси та каротиноїдів даного продуценту. Встановлено особливості динаміки росту *R. diobovatum* IMB Y-5023 на досліджуваних натуральних та синтетичних середовищах і необхідний час тривалості культивування дріжджів для отримання максимального виходу біомаси та каротиноїдів. Розроблено способи модифікації натуральних живильних середовищ для культивування *R. diobovatum* IMB Y-5023 з отриманням більшого виходу біомаси. Показана здатність досліджуваних дріжджів рости на середовищах – промислових відходах, що містять велику кількість ліпідів, після їх оптимізації. Досліджено вихід біомаси, вміст та склад каротиноїдних пігментів у біомасі *R. diobovatum* IMB Y-5023 за культивування на різних середовищах у темряві та при освітленості різної інтенсивності в діапазоні 0-5000 лк. Серед каротиноїдів *R. diobovatum* IMB Y-5023 були виявлені такі пігменти: β-каротин, астаксантин, лікопен і торулородин. Встановлено, що культивування *R. diobovatum* IMB Y-5023 можна здійснювати в темряві. Досліджено вплив складу живильних середовищ на вихід біомаси і каротиногенез дріжджів *R. diobovatum* IMB Y-5023. Вперше показано, що дріжджі *R. diobovatum* IMB Y-5023 здатні рости на середовищах з низьким вмістом глюкози.

Ключові слова: *Rhodospiridium diobovatum*, дріжджі, живильне середовище, ріст, біомаса, послідовне культивування, ліпіди, освітленість, каротиноїдні пігменти, моносахариди, олігосахариди.

АННОТАЦИЯ

Ельчищева Ю. В. Разработка способов культивирования каротиноносных дрожжей *Rhodospiridium diobovatum* IMB Y-5023. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Национальный технический

университет Украины «Киевский политехнический институт имени Игоря Сикорского» МОН Украины, Киев, 2018.

Диссертация посвящена разработке таких способов культивирования дрожжей *Rhodospiridium diobovatum* IMB Y-5023, которые позволят получить высокий выход биомассы и каротиноидов данного продуцента. Установлены особенности динамики роста *R. diobovatum* IMB Y-5023 на исследуемых натуральных и синтетических средах и необходимое время продолжительности культивирования дрожжей для получения максимального выхода биомассы и каротиноидов. Разработаны способы модификации натуральных питательных сред для культивирования *R. diobovatum* IMB Y-5023 с получением большего выхода биомассы. Показана способность исследуемых дрожжей расти на средах - промышленных отходах, содержащих большое количество липидов, после их оптимизации. Исследованы выход биомассы, содержание и состав каротиноидных пигментов в биомассе *R. diobovatum* IMB Y-5023 при культивировании на различных средах в темноте и при освещенности различной интенсивности в диапазоне 0-5000 лк. Среди каротиноидов *R. diobovatum* IMB Y-5023 были обнаружены следующие пигменты: β -каротин, астаксантин, ликопин и торулородин. Установлено, что культивирование *R. diobovatum* IMB Y-5023 можно осуществлять в темноте. Исследовано влияние состава питательных сред на выход биомассы и каротиногенез *R. diobovatum* IMB Y-5023. Впервые показано, что дрожжи *R. diobovatum* IMB Y-5023 способны расти на средах с низким содержанием глюкозы.

Ключевые слова: *Rhodospiridium diobovatum*, дрожжи, питательная среда, рост, биомасса, последовательное культивирование, липиды, освещенность, каротиноидные пигменты, моносахариды, олигосахариды.

SUMMARY

Ielchishcheva Iu.V. Development of cultivation methods for carotene-accumulating yeast *Rhodospiridium diobovatum* IMB Y-5023. – Manuscript.

Thesis for the degree of candidate of biological science in speciality 03.00.20 – Biotechnology. – National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute" of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2018.

The thesis is devoted to the development of cultivation methods of yeast *Rhodospiridium diobovatum* IMB Y-5023, which will allow to obtain a high yield of this producer's biomass and carotenoids.

The growth dynamics peculiarities of *R. diobovatum* IMB Y-5023 and the required yeast cultivation duration for obtaining maximum yield of biomass and carotenoids have been established on the investigated natural and synthetic media. Regardless of the medium used for *R. diobovatum* IMB Y-5023 cultivation (synthetic or natural), it should continue at least for 120 hours to obtain maximum amount of target products.

Modification methods of natural non-standard nutrient media have been developed for cultivating *R. diobovatum* IMB Y-5023 to obtain a greater biomass

yield. They include preliminary short-term (2 days) cultivation of *P. ostreatus* on wheat bran extract (BY), accompanied by changes in medium composition. Such changes in medium composition were accompanied by inhibition of *R. diobovatum* IMB Y-5023 growth on this medium. Short-term (5 min) heating to 100°C of modified *P. ostreatus* medium provided much better yeast growth on such medium with biomass yield, increased for at least 40%. Modified *P. ostreatus* medium was characterized by multiple increase in content of glucose and other low molecular weight sugars.

The methods for optimization of distillery corn vinasse (which is an industrial waste) nutrient medium for *R. diobovatum* IMB Y-5023 cultivation have been also developed. They include separation of source corn vinasse by flotation or dividing into fractions, as well as bringing vinasse pH up to 5 - 6.5. It has been found that yeast *R. diobovatum* IMB Y-5023 can grow on media, containing a large amount of lipids.

The biomass yield, content and composition of carotenoid pigments in biomass *R. diobovatum* IMB Y-5023 were investigated at cultivation in test media in the dark and at different intensity illumination in the range of 0-5000 lux. There was no direct dependence between the biomass yield of *R. diobovatum* IMB Y-5023 on different nutrient media in the dark and the accumulation of carotenoids in their cells. It has been discovered that the composition of carotenoid pigments in *R. diobovatum* IMB Y-5023 depends on the nutrient medium composition. Among carotenoids of *R. diobovatum* IMB Y-5023 there were identified the following pigments: β -carotene, astaxanthin, lycopene and torularhodin. For the first time, astaxanthin has been found among the carotenoid pigments of *R. diobovatum* IMB Y-5023

It has been established that cultivation of *R. diobovatum* IMB Y-5023 can be carried out in the dark. Illumination caused a different effect on yeast biomass accumulation and carotenoid content in it, depending on the culture medium. Illumination had an impact on the quantitative composition of *R. diobovatum* IMB Y-5023 carotenoid pigments and had no effect on their qualitative composition.

The impact of nutrient media composition on *R. diobovatum* IMB Y-5023 biomass yield and carotenogenesis has been investigated. For the first time it has been established that yeast *R. diobovatum* IMB Y-5023 can grow on medium with low output glucose content. An absence of direct correlation, or a presence of reverse correlation between the amount of consumed glucose and the biomass yield on the studied nutrient media has been found.

Defining of sugars composition in the investigated media before and after yeast cultivation, as well as calculated efficiency ratio of consumed sugars conversion into biomass and carotenoids, demonstrated that sugars composition in the culture medium determines metabolic direction of *R. diobovatum* IMB Y-5023. The correlation between different fractions of consumed sugars and studied parameters has been established.

Key words: *Rhodospiridium diobovatum*, yeast, nutrient medium, growth, biomass, sequential cultivation, lipids, illumination, carotenoid pigments, monosaccharides, oligosaccharides.